



Universidad Complutense de Madrid

Master en Ciencias Odontológicas

**Desarrollo del modelo de
boca artificial en flujo
continuo en el biorreactor
Lambda Minifor®**

Iñaki Suárez Soto

Tutor: Mariano Sanz Alonso

Septiembre 2013

Índice

1. Introducción	4
2. Justificación	14
3. Hipótesis	15
4. Objetivos	15
5. Material y Método	16
5.1. Selección de cepas de referencia y curvas de crecimiento	16
5.1.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo	16
5.1.2. Curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas	17
5.2. Biorreactor de Flujo Continuo	20
5.2.1. Medio de Cultivo	20
5.2.2. El Biorreactor	20
5.3. Formación del biofilm oral	23
5.3.1. Preparación del preinóculo de las 6 bacterias seleccionadas	24
5.3.2. Montaje, esterilización y preparación del sistema	25
5.3.3. Inserción del preinóculo	27
5.4. Toma de Muestras	29
5.5. Estudio de la formación del biofilm en la superficie seleccionada	30
5.5.1. Microscopía Laser Confocal (CLSM)	30
5.5.2. Cultivo Bacteriano	31
5.6. Análisis Estadístico	32
6. Resultados	34
6.1. Selección de cepas bacterianas y viabilidad de las mismas en el sistema de flujo continuo Lambda Minifor®	34
6.2. Análisis estructural y evaluación de la viabilidad de los biofilms por microscopía Laser Confocal (CLSM)	35
6.3. Análisis cuantitativo de los biofilms mediante la técnica de cultivo	42
7. Discusión	45
8. Conclusiones	53
9. Bibliografía	54

1. Introducción

Las bacterias están ampliamente distribuidas en la naturaleza, pudiendo presentar dos fenotipos de crecimiento: células individuales de libre flotación (planctónicas) o células agregadas en colonias de microorganismos sésiles. Este último se conoce comúnmente como el modo de crecimiento en biopelícula ó biofilm (Donlan, 2002). La capacidad de formar biofilm no parece restringirse a ningún grupo específico de bacterias y, en la actualidad, se considera que, bajo condiciones ambientales adecuadas la inmensa mayoría de estas, independiente de la especie, puede habitar en biofilms; se estima que aproximadamente el 99% de las células bacterianas están en la naturaleza en forma de biofilm, y tan sólo 1% vive en estado planctónico (Costerton JW y col., 1995; Donlan y Costerton, 2002).

Todas las superficies del cuerpo que están expuestas al medio ambiente, ya sea mucosas o piel, están colonizadas por bacterias y otros microorganismos (Costerton et al. 1999)(Hall-Stoodley et al. 2004); la superficie dental, por tanto, también se verá expuesta a ellos. Estos seres vivos pueden actuar de manera comensal o patógena, y ambos tipos conviven (Donlan & Costerton 2002). Hay un equilibrio muy delicado entre las distintas bacterias, por ello, cambios incluso leves, pueden propiciar el paso de salud a enfermedad (Jenkinson & Lamont 2005; C. J. Taylor & Mahenthiralingam 2006). La superficie dental no es indiferente a esto; sobre su superficie, el equilibrio entre bacterias, comensales y patógenas, se puede ver afectado por cambios debidos a una pobre higiene oral, condiciones sistémicas como la diabetes, condiciones ambientales como el tabaco, etc. Esto da lugar al cambio en el volumen y composición del biofilm y

puede dar lugar a la iniciación y posterior progresión de la enfermedad periodontal (Filoche et al. 2009)(Beighton 2009).

Como en la mayoría de las superficies corporales, sobre los dientes las bacterias se organizan en forma de biofilms (Marsh 2004). Para comprender mejor que es un biofilm, la definición más aceptada es la propuesta por Donlan y Costerton (Donlan & Costerton 2002): «una comunidad bacteriana inmersa en un medio líquido, caracterizada por bacterias que se hallan unidas a un sustrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes». Este biofilm oral está conformado por una gran diversidad de especies de bacterias, que están en constante competición por la colonización de las superficies, haciendo que haya un constante cambio de los tipos y cantidades de bacterias (Sedlacek & Walker 2007). Esto hace que sea un biofilm “dinámico”, dependiendo de varios factores físicos, químicos... Se han identificado más de 800 especies bacterianas en la cavidad oral, de las cuales, en los depósitos de placa dental de un individuo sano se han aislado y caracterizado más de 300 diferentes. Se ha visto que en 1mm cúbico de placa dental que pesa alrededor de 1mg hay presentes más de 10^8 bacterias (Filoche et al. 2009) .

La estructura del biofilm oral presenta los tres elementos característicos de estas comunidades altamente organizadas: grandes colonias de bacterias sésiles embebidas en una matriz polimérica extracelular y separadas unas de otras espacios intersticiales huecos. El crecimiento y maduración de la placa bacteriana se ha estudiado en profundidad, al igual que su crecimiento sobre

superficies duras, como el esmalte, la dentina, acrílico, metal, etc. utilizando diferentes técnicas tales como microscopía electrónica, microscopía de laser confocal, cultivos bacterianos, técnicas basadas en biología molecular, etc., siendo uno de los pioneros Theilade y Theilade (E. THEILADE & J. THEILADE 1985). Entre los diferentes ambientes que podemos encontrar en la cavidad oral, además de las superficies como reconstrucciones, prótesis e implantes, es posible reconocer una estructura muy similar de la placa bacteriana en sitios específicos. Según un estudio de Siegrist en el año 1991 (Siegrist et al. 1991) se vio que a pesar de las diferencias en rugosidad superficial, energía libre y carga, las características más importantes en el desarrollo inicial de la placa bacteriana en todos los materiales son similares.

La biopelícula bacteriana se desarrollo de una forma secuencial y reproducible (Aas et al. 2005)(Diaz et al. 2006)(Kolenbrander et al. 1990).

Al poco tiempo de introducir un material solido o tras finalizar la higiene dental se empieza a formar una capa de macromoléculas, que se adhieren a la superficie del material o dientes (esmalte, dentina). A ésta se le denomina “película adquirida” (**figura 1**). Está compuesta principalmente por glicoproteínas (mucinas) y anticuerpos. Algunas de estas moléculas tienen estructuras específicas que permiten que se adhieran sobre ellas estructuras

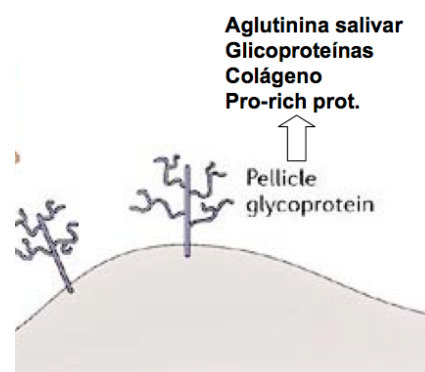


Figura 1. Representación de la “película adquirida”.

bacterianas, como polímeros extracelulares y fimbrias (prolongaciones bacterianas de carácter lipídico que tienen en su extremidad una terminación lectínica (**figura 2**).

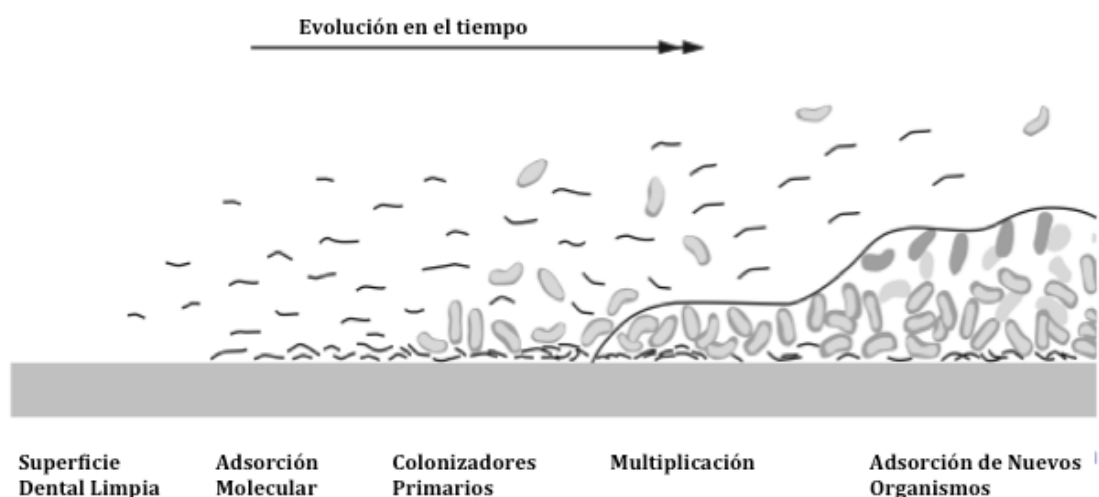


Figura 2. Formación del biofilm. Fase 1: Adsorción molecular, y formación de la película adquirida. Fase 2: Adhesión bacteriana, primeros microorganismos. Fase 3: Producción de la matriz extracelular y adhesión de más bacterias, y su multiplicación. Fase 4: Adsorción de mayor y distintas bacterias, aumentando la complejidad del biofilm.

Las primeras bacterias en adherirse, los colonizadores primarios, son principalmente *Streptococcus sanguis*, *S. oralis* y *S. mitis*, y algo posterior a ellos, especies de *Actinomyces*, *Neisseria*, *Prevotella* y *Veillonella* (Diaz et al. 2006). Estos colonizadores primarios son principalmente cocos y bacilos gram positivas, anaerobias facultativas. No obstante, dentro del grupo de los actinomyces hay algunas especies que son anaerobias estrictas. Este es el comienzo de la formación del nuevo biofilm, y como está descrito, una vez que una bacteria cambia de un estado planctónico a un biofilm también cambia su

comportamiento. Comienzan a sintetizar polímeros extracelulares y a multiplicarse a mayor velocidad. Así, la placa bacteriana va incrementando en grosor, generándose unos gradientes de oxígeno, habiendo poca difusión de oxígeno en las capas más profundas de la masa bacteriana.

Tras la unión de estos a la película adquirida y entre sí, se empiezan a adherir los colonizadores secundarios, representado principalmente por *Fusobacterium nucleatum*, bacteria “puente” puesto que es de gran importancia en la adhesión de los colonizadores tardíos (**figura 2 y 3**). Los colonizadores secundarios y tardíos son microorganismos gram negativos, anaerobios estrictos, que tienen poca habilidad para unirse a la película adquirida, adhiriéndose a estructuras de los colonizadores primarios o sus productos. Los colonizadores tardíos presentan un alto potencial periodonto-patógeno elevado. Estos son principalmente: *Treponema denticola*, *Porphyromonas gingivalis* y *Tannerella forsythia* (Kolenbrander & London 1993)(Kolenbrander et al. 2002), miembros del complejo “rojo” según la clasificación de Sigmund Socransky en el año 1998 (Socransky et al. 1998). Hay un caso especial, el del *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, considerado en ocasiones como colonizador primario y en otras como tardío.

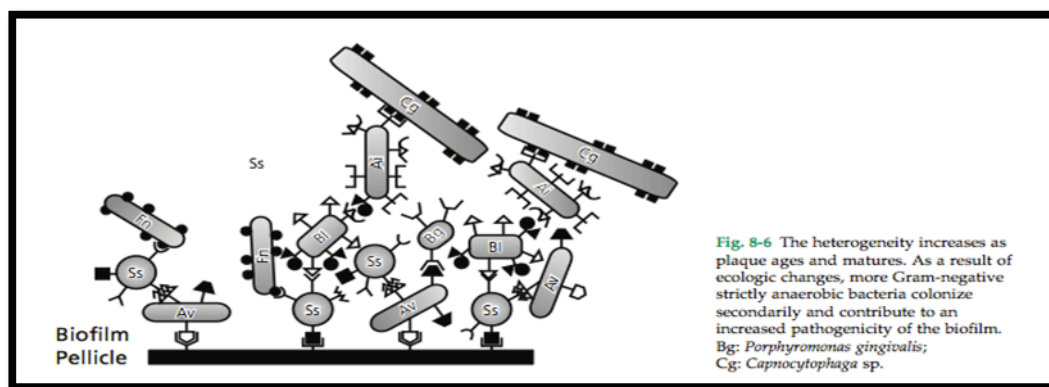


Figura 3. Representación esquemática de las primeras fases de formación de un biofilm bacteriano sobre una superficie oral.

Por consiguiente, la asociación de las bacterias en los biofilms orales no es aleatoria sino que hay asociaciones específicas entre especies bacterianas. Socransky y Haffajee examinaron más de 13.000 muestras de placa subgingival, de 185 adultos e identificaron seis grupos de especies bacterianas asociadas, que incluían colonizadores iniciales, como *S. oralis* con capacidad para fijarse a diferentes receptores de la película dental y proveer de receptores a especies como *F. nucleatum*, intermedios y tardíos (Socransky et al. 1998) **(figura 4)**.



Figura 4: Complejos microbianos subgingivales, adaptado de Socransky et al. 1998

En la cavidad bucal es posible reconocer una composición muy similar de la placa bacteriana en las diferentes localizaciones (supragingival, subgingival, además de la localizada en superficies como reconstrucciones, prótesis e implantes), solamente hallando variaciones considerables en los microorganismos predominantes detectados, debidos en gran parte a la estrecha relación entre las propiedades del hábitat y los organismos que son capaces de predominar (Ximénez-Fyvie et al. 2000)(Aas et al. 2005)(Paster et al. 2005)(Marsh 2004). Al igual que la influencia del oxígeno, la disponibilidad y variedad de productos utilizados como alimentos es de gran importancia y condicionamiento del biofilm.

En bolsas poco profundas los productos dietéticos consumidos por el huésped son una fuente importante de nutrientes, sobre todo para las bacterias del biofilm más supragingival. No obstante, a medida que va creciendo el biofilm, y

éste causando la inflamación del tejido periodontal, con su consecuente incremento de la profundidad de la bolsa periodontal, estos nutrientes no llegan a las zonas más profundas del biofilm, siendo la fuente principal de alimento los restos hidrolizados de periodonto y sangre. Las bacterias periodontopatógenas encontradas en las bolsas periodontales producen enzimas hidrolíticas que hidrolizan macromoléculas del huésped en aminoácidos. También, la acumulación de placa da lugar a una reacción inflamatoria, que incrementa la secreción de fluido crevicular y sangre generándose un ambiente propicio para la multiplicación y crecimiento de las especies gram negativas anaerobias estrictas con gran potencial periodontopatógeno.

Por consiguiente, cuanto más tiempo pasa y más se incrementa el biofilm, este va cambiando su composición (y la proporción de diferentes especies), de cocos gram positivos anaerobios facultativos hacia un biofilm compuesto mayoritariamente por bacilos gram negativos anaerobios estrictos. Esto es promovido por la inflamación ocasionada por la placa bacteriana, que a su vez se convierte en un incremento de la profundidad de la bolsa periodontal.

Los biofilms orales son la causa del desarrollo de enfermedades orales, como la caries y las enfermedades periodontales (Löe et al. 1965)(Löe et al. 1978) (Baelum et al. 1988)(Baelum & Fejerskov 1986), algunas de las enfermedades más prevalentes del ser humano. De aquí la gran importancia que tiene el estudio de su formación, composición, progresión, etc.

Más aún, hay estudios que han relacionado la enfermedad periodontal con otras enfermedades sistémicas, como el parto prematuro (Offenbacher et al. 1996)(Jarjoura et al. 2005)(Goepfert et al. 2004)(Jeffcoat et al. 2001), la diabetes

(Seppälä et al. 1993)(Saremi et al. 2004)(G. W. G. Taylor et al. 1996)(G. W. G. Taylor et al. 1998), enfermedades respiratorias (Scannapieco et al. 2003) (Scannapieco et al. 1992)(Scannapieco 1999) y enfermedades cardiovasculares (Beck et al. 2001)(BECK et al. 2005)(Desvarieux et al. 2005)(Pussinen et al. 2004)(Engebretson et al. 2005).

Esto último hace de gran relevancia a las enfermedades periodontales, puesto que no es ya solo por su importancia a nivel local (oral), sino a nivel sistémico.

Combatir la formación del biofilm dental es una de las medidas más efectiva para la prevención de las enfermedades periodontales. Las bacterias incluidas en un biofilm presentan una organización estructural que las hace resistentes a los mecanismos de defensa del hospedador. Los biofilms, revestidos por la matriz extracelular y conteniendo múltiples microcolonias bacterianas en su interior, se convierten en estructuras demasiado grandes como para ser fagocitadas, reduciendo la accesibilidad del sistema inmune. Por añadidura, el biofilm provee de una barrera física que aumenta la resistencia de patógenos a las defensas del hospedador, como la opsonización, lisis por complemento ó fagocitosis (Post et al. 2004). Aún así, los biofilms provocan respuestas inmunes celular y humoral, demostradas por la identificación de citoquinas liberadas por leucocitos expuestos a biofilm. Sin embargo, debido a su aislamiento del entorno por la matriz y su reducido estado metabólico, esta respuesta sistémica es muy pequeña (Donlan & Costerton 2002).

Otra ventaja de coexistir en biofilm, extremadamente importante desde el punto de vista clínico, es que las bacterias incluidas en biofilms son muy resistentes a los antibióticos, siendo capaces de sobrevivir frente a concentraciones

antibióticas miles de veces mayor respecto a las bacterias planctónicas (Huang et al. 2011).

2. Justificación

Es necesario estudiar el comportamiento de las bacterias orales en biofilm para poder tratar eficazmente la enfermedad derivada de su acción. El estudio *in vivo* de estas comunidades conlleva un problema ético, además de complicaciones metodológicamente hablando, por lo que los diferentes grupos de investigación de este campo están desarrollando modelos *in vitro* que permitan un estudio adecuado. En éste trabajo de investigación, el objetivo es conseguir un modelo de placa subgingival en modalidad dinámico, que reproduzca con precisión las complejas condiciones que ofrece el ambiente oral y evaluar su fiabilidad y precisión.

Previo a este trabajo, el grupo de investigación ha desarrollado un modelo de biofilm subgingival *in vitro*, reproducible y sencillo de manejar, en un sistema de flujo estático (Sánchez et al. 2011). Este modelo estático cumple muchas de las características necesarias para poder desarrollar un biofilm estático, pero le faltaba el dinamismo que está presente en la boca. Las bacterias en la cavidad oral están sometidas al flujo salivar y crevicular de una manera constante. Estos condicionan las propiedades estructurales (topográficas y arquitectónicas) y fisiológicas del biofilm bacteriano formado sobre la superficie dental. Por consiguiente los modelos estáticos, necesarios en un principio, no son suficientes para simular estas condiciones dadas en la cavidad oral. De hecho hay estudios que demuestran que la estructura y propiedades del biofilm son diferentes dependiendo de si se trata de un modelo estático o dinámico (Vaughan et al. 2010)(Drescher et al. 2011).

3. Hipótesis

Basándonos en estudios anteriores, vamos a desarrollar un modelo *in vitro* de biofilm oral reproducible y sencillo de manejar, en un sistema de flujo continuo, inoculando bacterias representativas del biofilm oral en un medio ambiente físico-químico similar al de la cavidad bucal, que será la base para el estudio del efecto de sustancias antisépticas sobre dichas comunidades, sin los problemas éticos que supone trabajar con pacientes con enfermedad.

4. Objetivos

Los objetivos son:

1. Seleccionar bacterias representantes de la microbiota del biofilm subgival y conocer su curva de crecimiento.
2. Comprobar que cada una de las especies por separado son capaces de crecer adecuadamente en el sistema propuesto.
3. Desarrollar un biofilm *in vitro* semejante al formado sobre los dientes *in vivo* sobre discos de hidroxiapatita, que simulan el esmalte dental.

Estudiaremos:

- 3.1. La estructura tridimensional de los biofilms generados en el sistema mediante microscopia laser confocal.
- 3.2. La presencia de las bacterias usadas en el estudio y la ausencia de contaminación por otras bacterias, y cuantificaremos el total de las mismas incorporadas en el biofilm hasta alcanzar la madurez (1h, 12h, 24h, 48h, 72h y 96h).

5. Material y Método

5.1. Selección de cepas de referencia y curvas de crecimiento

5.1.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo

La formación de un biofilm con bacterias orales sobre superficie de hidroxiapatita se ha realizado seleccionando bacterias que representan a los colonizadores primarios, secundarios y tardíos: *S. oralis*, *A. naeslundii*, *V. parvula*, *F. nucleatum*, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis*. Las cepas utilizadas y las colecciones de cultivo tipo a la que pertenecen se muestran en la **Tabla 1**. Las cepas se mantienen crio- conservadas a -80°C.

Tabla 1. - Cepas seleccionadas en el estudio y colección de cultivo tipo

Cepa	Referencia
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	DSMZ ¹ 20482
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	DSMZ 8324
<i>Veillonella parvula</i>	NCTC ² 11810
<i>Actinomyces naeslundii</i>	ATCC ³ 19039
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277
<i>Streptococcus oralis</i>	CECT ⁴ 907T

¹DMS, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und ZellKulturen

²NCTC, National Collection of Type Cultures

³ATCC, American Type Cultures Collection

⁴CECT, Colección Española de Cultivos Tipo

Las bacterias se crecieron en placas de medio Agar Sangre (Oxoid no 2; Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) (**figura 5**), suplementado con un 5% de sangre de caballo, Hemina (5 mg/L) y Menadiona (1 mg/L), en condiciones de anaeróbicas (10% H₂, 10% de CO₂ y N₂ en equilibrio) a 37°C entre 24- 72h.

5.1.2. Curvas de crecimiento de las cepas seleccionadas

Con el fin de estandarizar las condiciones del estudio e inocular una concentración constante de cada una de las cepas en todos los ensayos, favoreciendo así la reproducibilidad del modelo, se emplearon las curvas de crecimiento de cada bacteria, que fueron realizadas con anterioridad, para el desarrollo



Figura 5: Placa Agar-Sangre

del modelo de biofilm estático (Sánchez et al. 2011). Estas curvas permitieron relacionar con facilidad los datos de densidad óptica (D.O), tiempo de generación y unidades formadoras de colonia (ufc) por mililitro (ufc/mL).

Los ensayos se han realizado en 100 mL del medio denominado BHI2, que consiste en medio BHI [medio Brain Heart Infusion (Becton, Dickinson and Company; EE.UU.), suplementado con:

- Mucina (2,5 g/L)
- Extracto de levadura (1,0 g/L)
- Cisteína (0,1 g/L)
- Bicarbonato sódico (2,0 g/L)
- Hemina (5 mg/L)
- Menadiona (1 mg/L)
- 0,25% de ácido glutámico (v/v)]

Se preparó un preinóculo a partir de una colonia de un cultivo fresco en placas de medio Agar Sangre suplementado, que se inculó en 15 mL de medio BHI2, incubándolo en anaerobiosis a 37°C, durante 24-72h en función de la especie bacteriana. Entre 100-300 µL del preinóculo se adicionó a 100 mL de medio BHI2 fresco, para comenzar la curva en la fase “lag” o de aclimatación (aproximadamente 0,05 de D.O).

A determinados intervalos de tiempo, en función de la especie bacteriana, se fueron realizando medidas de la D.O a 550 nm. Las medidas de la densidad óptica se realizaron en un espectofotómetro (**figura 6**), previamente calibrado con dos cubetas de medio BHI2, para posteriormente introducir 1 mL de cada una de las bacterias en sus respectivas cubetas y medir su densidad óptica, siempre dejando uno de los controles en el equipo.

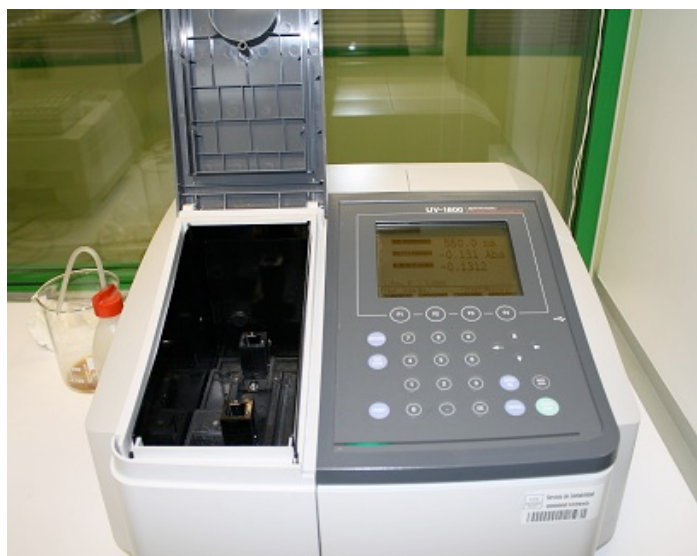


Figura 6. Espectofotómetro.

Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de Univ. Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de Univ. Complutense de Madrid

Igualmente, se fueron tomando alícuotas de 100 µL, que fueron diluidas de forma seriada en buffer PBS estéril (por sus siglas en inglés Phosphate Buffered Saline) y sembradas en placas de Agar Sangre suplementado, siempre por duplicado, por

el método de siembra en superficie. Las placas inoculadas se incubaron en anaerobiosis a 37°C. Después de 4 a 7 días de incubación, se realizó el recuento de las UFC por placa, para determinar el número total de UFC/mL.

De esta manera se relacionaron el tiempo de crecimiento, la medida de D.O. y las UFC/mL correspondientes.

Las curvas de crecimiento obtenidas en el estudio previo (Sánchez et al. 2011), y que han sido confirmadas en el presente trabajo, se muestran en la **figura 7**.

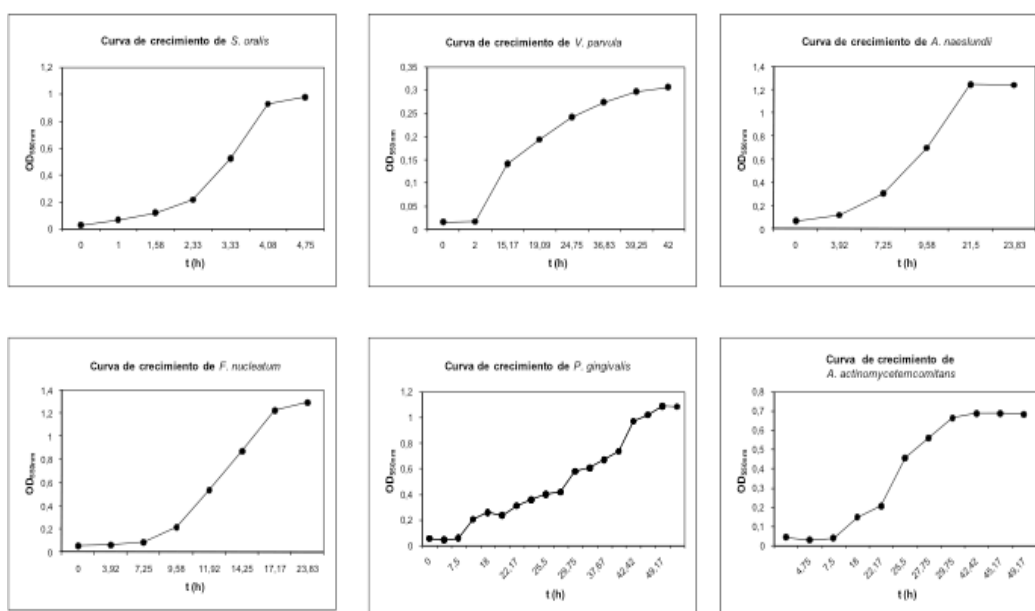


Figura 7: Curvas de crecimiento utilizados en el modelo Sánchez et al. 2011.

5.2. Biorreactor de Flujo Continuo.

5.2.1. Medio de Cultivo

Hemos formulado un medio de cultivo, que denominamos BHI2, que contiene una proporción elevada de proteínas, similar tanto al fluido gingival crevicular, principal fuente de nutrientes de las bacterias subgingivales *in vivo*, como la saliva, puesto que incorpora mucina. Ésta es fundamental para la formación de la película adquirida sobre la superficie en la que se va a generar el biofilm.

Este medio, el mismo con el que hemos realizado las curvas de crecimiento, consiste en medio BHI [medio Brain Heart Infusion (Becton, Dickinson and Company; EE.UU.), suplementado con: mucina (2,5 g/L), Extracto de levadura (1,0 g/L), cisteína (0,1 g/L), bicarbonato sódico (2,0 g/L), hemina (5 mg/L) menadiona (1 mg/L) y 0,25% de ácido glutámico (v/v)].

5.2.2. El Biorreactor

Entre los diferentes modelos de biofilm utilizados para reproducir la placa dental hemos seleccionado un modelo con un biorreactor Lambda Minifor® asociado a un sistema de flujo continuo.

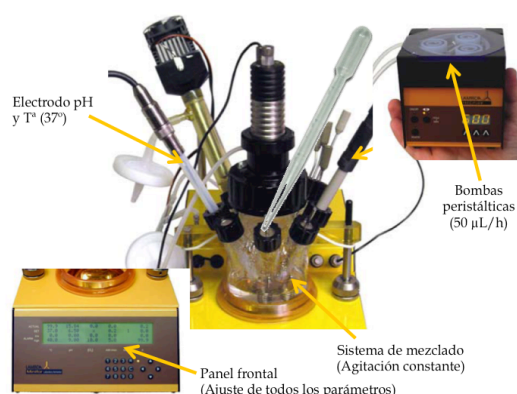


Figura 8: Diferentes elementos que incluye el sistema *Lambda Minifor®*.

El sistema está compuesto por:

- A. Un recipiente de alimentación (**figura 9**) que contendrá el medio de cultivo.
- B. El biorreactor: Se trata de un sistema destinado al crecimiento y mantenimiento de las bacterias en estado planctónico. El cual se subdivide en:



Figura 9: Alimentador

- Vessel o frasco fermentador, en el centro, en el que realizaremos la inoculación bacteriana.
- Unidad básica, que soporta al frasco fermentador, y se compone de una base calefactora con el panel de control de funciones incorporado (**figura 8**).
- Bombas peristálticas (de entrada y salida del vessel): sobre unos soportes que salen de la unidad básica se encuentran las dos bombas (**figura 8**). Estas se encargan de pasar el BHI2 con contenido bacteriano dentro y fuera del vessel, desde el recipiente de alimentación al vessel, y desde este último hacia el Robbins Device.

El sistema de mezclado o bombeo (**figura 10**) que está monitorizado desde la unidad básica, se introduce a través

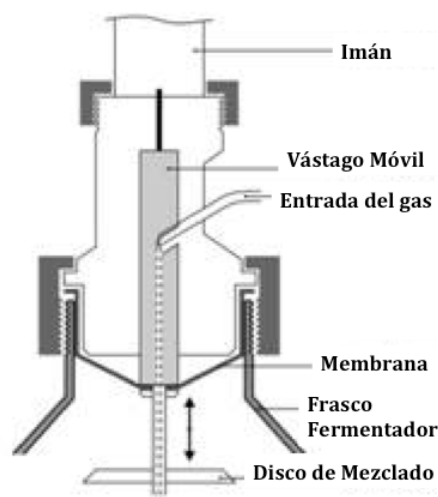


Figura 10: Sistema de Mezclado

de la entrada principal-central del vessel, que se haya en la parte superior. Este sistema es de funcionamiento distinto. En lugar del tradicional agitador en hélice, el Minifor utiliza un nuevo sistema vibrador. Un potente electroimán que mueve el disco mezclador (perforado en la punta, para la salida del gas de anaerobiosis) hacia arriba y hacia abajo. La principal ventaja es una mezcla eficiente y una aireación del medio de cultivo. Mantiene el interior del vessel totalmente aislado. En cuanto a la entrada de aire, ésta se efectúa a través de varios capilares fijados en el disco inferior, en la punta de este. Esta vibración se encarga de mantener en estado planctónico las bacterias. Se puede variar la velocidad de mezclado, nosotros la mantenemos constante a 0,2 MHZ.

- Medidor de pO_2
- pH-metro y Termometro (Mismo aparato)
- Tubo de entrada, desde el recipiente de alimentación
- Tubo de salida, hacia el Robbins Device
- Tubo de plástico sellado, desde un codo, para toma de muestras e inoculación de las cepas bacterianas al vessel
- Entrada del sistema de refrigeración

Todos estos últimos instrumentos (referidos desde el medidor de pO_2) acceden al interior del vessel por una de las múltiples entradas laterales. Estas entradas están perfectamente aisladas del medio ambiente mediante un sistema aislado compuesto por un tapón y gomas de silicona, que no permiten la entrada y salida

de materia orgánica e inorgánica y que permite el mantenimiento de la presión generada dentro del vessel.

C. Un dispositivo denominado

“Robbins device” (figura 11),

que contiene los discos del material hidroxiapatita, sobre el que estudiaremos la

formación del biofilm. Los discos tienen unas

dimensiones de: 7mm de diámetro y 1,8mm de grosor. El Robbins Device está soportado por una placa calefactora que mantiene la temperatura constante de 37°C, para que las bacterias se mantengan a la misma temperatura que en el biorreactor.

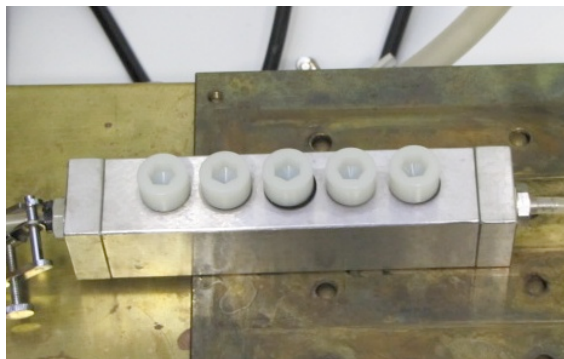


Figura 11: Robbins Device

D. Aparatos Accesorios: Botella de anaerobiosis. Sistema de refrigeración y eliminación de presión. Recipiente de recogida final, donde se desecha el BHI2 que contiene las bacterias que no se han adherido a los discos de hidroxiapatita.

5.3. Formación del biofilm oral

El proceso para la formación del biofilm en el sistema se desarrolla en varias fases, que incluyen:

- Preparación de los preinóculos de las 6 bacterias seleccionadas en el estudio
- Preparación del sistema: medio de cultivo, montaje y autoclavado

- Mantenimiento de las bacterias en un estado planctónico y en fase exponencial de crecimiento en el vessel en unas condiciones físico-químicas idóneas.
- Una vez alcanzado este nivel, se acciona el sistema de flujo dinámico, fluyendo así el medio de cultivo con las bacterias hasta el Robbin device, donde se encuentran los discos de hidroxiapatita en los que se formará en biofilm.

5.3.1. Preparación del preinóculo de las 6 bacterias seleccionadas

Partiremos de las cepas seleccionadas, descritas en la Tabla 1, conservadas a -80°C. Realizamos un cultivo en placas de agar sangre a partir de las criobolas de las cepas mencionadas e incubaremos en jarras de anaerobiosis (10% H₂, 10% de CO₂ y N₂ en equilibrio) (**figura 12**) a 37°C entre 24- 72h.

Llevamos las muestras a la campana de flujo (**figura 13**), cerca de un mechero bunsen, para obtener condiciones de esterilidad optimas. Preparamos tubos de plástico estériles de 50 mL de capacidad (falcons) con 15ml de BHI2. Inocularemos cada una de las bacterias individualmente y siempre se acompañaran de un tubo que contenga solo medio de cultivo como



control. Para ello, extraemos una o dos colonias de las placas, ayudados por las asas de siembra e introduciremos la muestra en uno de los falcons, con movimientos de agitación para desprender bien la muestra. Cerramos el falcon, lo vorteamos, y acompañado del falcon control de nuevo lo incubaremos en condiciones de anaerobiosis, a 37°C, durante 12 horas. Pasadas estas horas,

sacamos los falcons, tomamos una muestra de cada falcon, incluido el control y realizamos una medida por espectrofotometría. Calibraremos en 0 el espectrofotómetro con el control y a continuación tomando las medidas de las muestras. Calculamos las ufc/mL mediante la medida de espectrofotometría obtenida basándonos en las curvas de crecimiento, ya calculadas con anterioridad (**figura 7**).



Figura 13: Campana de flujo y material en esterilidad

5.3.2. Montaje, esterilización y preparación del sistema

Se procede al montaje del equipo. En primer lugar se prepara el medio de cultivo. Este es el BHI2 ya descrito anteriormente. A continuación, se conecta el recipiente de alimentación al vessel, vía tubos de plástico. A su vez se conecta éste último, también vía tubos de plástico al Robbins Device, que contiene los discos de hidroxiapatita (previamente limpiados). Introducido al vessel central también se encuentran el medidor de pH y de temperatura, el medidor de pO_2 y la parte final del sistema de refrigeración. La medición de pH se hace por medio de un electrodo, que se combina con un sensor de

temperatura. La calibración del electrodo es semiautomática. Pero se ha de hacer previo a la esterilización del material. Hay que hacer una calibración con un medio básico y ácido. Por la parte superior se introduce el sistema de mezclado. Una vez ensambladas todas las partes del equipo, está preparado para la esterilización, exceptuando la base calefactora con el panel de funciones y mezclado, el sistema de refrigeración, la botella de anaerobiosis y el recipiente de recogida final.

Todo esto es traspasado al autoclave, donde será sometido, durante 21 minutos, 120°C y 1,0 atmosfera de presión a un proceso de esterilización por calor húmedo.

Una vez autoclavado se pasa todo el material a la campana de flujo y se procede a la adición del ácido glutámico, hidróxido sódico y hemina menadiona en el recipiente de alimentación. Se procede al cierre y aislamiento total del sistema.

Se pasa al montaje en el "sistema fijo". Se coloca el vessel sobre la unidad básica, eje central del sistema. Se conecta el tubo de plástico que conecta el vessel con el recipiente de alimentación al sistema de bombeo de entrada (bomba peristáltica) al vessel (también conocido como frasco fermentador). Se activa y se espera hasta que se llene el frasco fermentador a 220ml. Ésta cantidad se va a mantener constante durante todo el experimento. Una vez esté con ésta cantidad se procede al ajuste del medidor de pO_2 . Para ello simplemente se conecta el cable indicado, que sale de la Unidad Básica, a la terminación externa del medidor y se realiza una calibración semiautomática, ayudado por el panel de control. La regulación del oxígeno disuelto se obtiene

con la variación del caudal del aire. Finalizado esto, se procede a la inserción, vía tubo de plástico, a través del vástago del sistema del gas de anaerobiosis y activación del sistema de mezclado. Este viene desde una botella de anaerobiosis que contiene el gas, compuesto por: 10% H₂, 10% de CO₂ y N₂ en equilibrio. El caudal de aire puede ser programado entre 0 y 5l/min en etapas de 0,01 L. Se utiliza un preciso caudalímetro másico para gas. La medición es independiente de la variación de presión de oxígeno y temperatura del aire. Una válvula (**figura 14**) proporcional ajusta el caudal del aire. Ésta válvula se haya en la punta del sistema de mezclado, justo por debajo del disco de mezclado. Después comprobamos que la temperatura dentro del biorreactor es de 37°C y el pH es de 7.2 (7.0-7.5) y se mantiene constante. Cuando se ve que los niveles de pO₂ son de 0 o cercanos a este, se activa el sistema de refrigeración y regulación de presión, para evitar exceso de temperatura y presión originado dentro del vaso fermentador. Una vez, comprobado que todas las condiciones son estables, se pasa a la inserción del preinóculo.



Figura 14: Disco Mezclado

5.3.3. Inserción del preinóculo

Una vez que se ha confirmado que las 6 cepas bacterianas están en las condiciones de crecimiento apropiadas, y se ha creado un ambiente idóneo para el crecimiento de las mismas, se realiza un preparado con un mililitro de cada uno de los preinóculos. Se adicionarán al vessel en condiciones de

esterilidad. La cantidad de BHI2 de 220 mL se mantiene constante todo el experimento, gracias a las bombas peristálticas.

5.3.3.1. Adición bacteriana individualmente

Antes de realizar la inoculación de las seis bacterias conjuntamente, comprobamos individualmente que cada especie bacteriana era capaz de crecer y multiplicarse en el medio (BHI2) en el frasco fermentador.

Para ello, insertamos individualmente los distintos preinóculos. Dejamos la bacteria multiplicarse durante 12 horas. Para esto, el sistema de flujo (bombas peristálticas) se mantuvo inactivo. Esto se debe a que las bacterias necesitan un tiempo de adaptación, o aclimatación, al medio nuevo al que son insertadas, antes de empezar a multiplicarse y encontrarse en la fase exponencial.

A las 12 horas se tomaron alícuotas de 100 μ L, que fueron diluidas de forma seriada en buffer PBS estéril y sembradas en placas de Agar Sangre suplementado, siempre por duplicado, por el método de siembra en superficie. Las placas inoculadas se incubaron en anaerobiosis a 37°C. Después de 4 a 7 días de incubación, se realizó el recuento de las ufc por placa, para determinar el número total de ufc/mL.

5.3.3.2. Adición de las 6 cepas bacterianas al vessel central

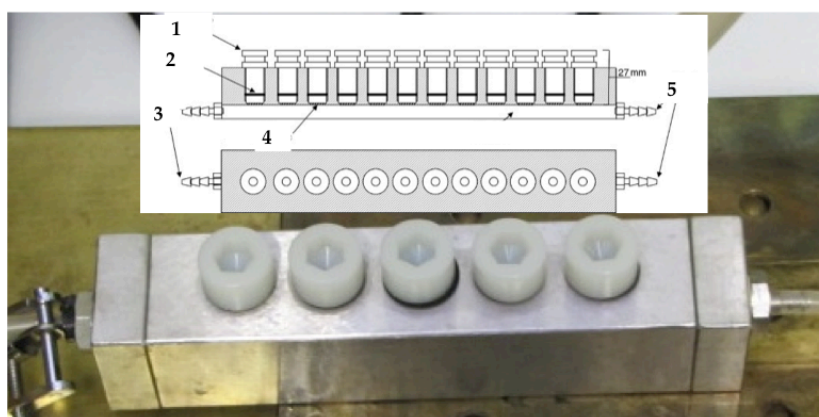
Una vez comprobado que cada bacteria se multiplicaba independientemente en el biorreactor, se pasó a la inoculación de todas las bacterias en conjunto. Se utilizó la misma cantidad de preinóculo que el que se utilizó durante la comprobación de bacterias individualmente, 1ml por bacteria. Se esperó 12

horas a que se completara la fase de adaptación y se inició el sistema de flujo de continuo. Mediante la activación de las bombas peristálticas de entrada y de salida, a una velocidad que imita el flujo salival no estimulado, en boca. Este es 30ml/h {Blanc:2013ui}. El BHI2 es transportado desde una botella de 5litros, a través del sistema de bombeo, donde entra en el biorreactor a la velocidad de 30ml/h. Una vez aquí se mezcla con las bacterias mediante un sistema de “mezclado”. Del Biorreactor sale a una velocidad idéntica de entrada pasando por un tubo de silicona estéril hasta llegar al “Robbin Device”, donde se encuentran los discos de hidroxiapatita. Una vez pasan a través del Robbin Device, las bacterias que no se han adherido a los discos y el BHI2 restante continúan por otro tubo de silicona estéril al otro extremo del Robbin Device y salen al exterior, donde caen a un vaso recolector.

Una vez que haya completado el tiempo de exposición de los discos de hidroxiapatita al BHI2 con las 6 bacterias se para el sistema.

5.4. Toma de Muestras

Una vez finalizado el tiempo de exposición se separa el Robbins device, con sus discos de hidroxiapatita, del resto del sistema (**figura 15**). El tiempo de exposición bacteriana será de 1, 12, 24, 48, 72 y 96 horas. Para esto se procede al aislamiento de ambos extremos del Robbins Device, pinzando los tubos de plástico de entrada y salida, que se lleva a la cabina de flujo laminar, donde, en condiciones de esterilidad se retiran los discos de hidroxiapatita con el biofilm formado para posterior análisis, ya sea por cultivo o microscopía.



- | | |
|----------------------------|------------------------|
| 1. Tornillo de Anclaje | 4. Entrada al Tornillo |
| 2. Disco de Hidroxiapatita | 5. Boca de Salida |
| 3. Boca de Entrada | |

Figura 15: Vista Interna y Externa del Robbins Device

5.5. Estudio de la formación del biofilm en la superficie seleccionada

5.5.1. Microscopía Laser Confocal (CLSM)

Previamente al estudio por microscopía los discos son extraídos y lavados en 2 mL de PBS estéril tres veces, durante 10 segundos, para retirar las bacterias no adheridas. A continuación, se tiñó con el Kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.), que proporciona una combinación de dos fluorocromos: “SYTO 9 green-fluorescent nucleic acid stain” y “Ioduro de Propidio red-fluorescent nucleic acid stain”, que se diferencian en sus características espectrales y en su capacidad de penetración en las células bacterianas. El fluorocromo SYTO 9 es capaz de penetrar en todas las bacterias presentes en una muestra, tanto con las membranas celulares intactas como dañadas. En contraste, el Ioduro de Propidio penetra únicamente en bacterias con membranas dañadas, causando una reducción de la fluorescencia del SYTO 9 cuando los dos fluorocromos están presentes en la misma célula. Por tanto, la

combinación adecuada de ambos fluorocromos, permite marcar las células bacterianas de una muestra, de forma que las bacterias con sus membranas celulares intactas presentarán fluorescencia verde, mientras que las bacterias con la membrana dañada emitirán fluorescencia roja. La máxima excitación/emisión para estos fluorocromos es de aproximadamente 480/500 nm para SYTO 9 y 490/635 nm para Ioduro de Propidio.

Para obtener la señal óptima de fluorescencia se ha puesto a punto la técnica previamente, utilizando diferentes ratios de concentración de los fluorocromos y diferentes tiempos de tinción. Se ha seleccionado el ratio 1:1 y el tiempo de tinción de 9 ± 1 min.

5.5.2. Cultivo Bacteriano

Los discos de hidroxapatita son extraídos y lavados en 2 mL de PBS estéril tres veces, durante 10 segundos, para retirar las bacterias no adheridas. A continuación, se introducirán en un 1 mL de PBS, sometiéndose 3 min a agitación por vortex para disgregar el biofilm.

A continuación, se tomaron alícuotas de 100 μ L, que fueron diluidas de forma seriada en buffer PBS estéril y sembradas en placas de Agar Sangre suplementado, siempre por duplicado, por el método de siembra en superficie. Las placas inoculadas se incubaron en anaerobiosis a 37°C. Después de 4 a 7 días de incubación, se realizó el recuento de las UFC por placa, para determinar el número total de UFC/mL.

5.6. Análisis Estadístico

Para estudiar la evolución temporal del biofilm se transforman las unidades ufc/ml de cada ensayo en logaritmos. Posteriormente es hallada la media por especie. Son representados en gráficas lineales. Para el análisis de esta concentración bacteriana utilizamos contrastes de hipótesis para los distintos tiempos de incubación.

Previo a este se realizan las pruebas de normalidad por tiempos de incubación de cada una de las bacterias. Debido al escaso tamaño de muestra, que imposibilita el cálculo de la prueba de kolmogorov, y a que incluso para los tiempos de incubación en los que si puede realizarse se obtiene falta de normalidad en muchos, se realizan los contrastes mediante pruebas no paramétricas. Aunque se dan casos en los que a partir de los test de normalidad se podrían considerar muestras normales, las escasas observaciones e imputación de valores hace que optemos por test no paramétricos en todos los casos. Por consiguiente, el contraste de hipótesis utilizado es el Contraste de Friedman.

Los datos, en el caso de la altura de los biofilms, fueron calculados como micrómetros (μm) y como porcentaje (%) en el caso de la vitalidad celular. Este ultimo a partir del área ocupada por las células vivas y las muertas obtenido por el análisis de las micrografías del CLSM mediante el software Metamorph® 7.6.

Se realizó un análisis a nivel de experimento para cada parámetro de estudio ($n = 9$). Se aplicó el test de Shapiro-Wilk para cada variable y los datos se expresaron como medias y desviaciones estándar (DS), además se han utilizado Box-plots

para la presentación gráfica de los datos. Para el contraste de tanto la vitalidad, como altura del biofilm utilizamos cómo contraste el Test de Wilcoxon.

Se realizó la media de la proporción de bacterias/volumen de biofilm a las 48h y 72h y se aplicó un estadístico de contraste, el test de Wilcoxon, para ver si había diferencias estadísticamente significativas, entre los biofilms generados.

Se empleó el software IBM® SPSS® 19.0 para todos los análisis de datos.

6. Resultados

6.1. Selección de cepas bacterianas y viabilidad de las mismas en el sistema de flujo continuo Lambda Minifor®

En primer lugar, se procedió a la selección de las cepas más idóneas para el desarrollo de un modelo de biofilm subgingival. Basándonos en modelos anteriormente desarrollados por el equipo de investigación (Sánchez et al. 2011){Blanc:2013ui}, se seleccionaron las cepas detalladas en la **Tabla 1** ya que representan a colonizadores primarios (*S. oralis* y *A. naeslundii*), tempranos (*V. parvula*), secundarios (*F. nucleatum*) y tardíos (*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*).

Para estandarizar las condiciones del estudio e inocular una concentración constante de cada una de las cepas en todos los ensayos, y favorecer así la reproducibilidad del modelo, se comprobó el número de bacterias que se obtenían tras incubar cada una de las especies seleccionadas en 15 ml de BHI2 durante 12 h, en condiciones de anaerobiosis y 37°C de temperatura, tanto por espectrofotometría (se emplearon las curvas de crecimiento de cada bacteria (**figura 7**), que permitieron relacionar con facilidad los datos de densidad óptica, tiempo de generación y ufc/mL) como por cultivo. El ensayo se repitió por triplicado, en días distintos y con diferentes preinóculos de partida. El resultado fue del orden de 10^9 ufc/mL para todas las especies bacterianas.

Una vez estandarizada las condiciones de inoculación (1 mL de cada una de las bacterias seleccionadas a 10^9 ufc/mL), fueron realizados experimentos individuales con cada bacteria en el sistema de flujo Lambda Minifor®. Se inoculó 1 mL de cada preinóculo (10^9 ufc/mL) de forma independiente, en condiciones de esterilidad descritas en el apartado de materiales y métodos, en

el vessel que contenía previamente 220 mL aproximadamente de medio BHI2, a 37°C, en condiciones de anaerobiosis y en constante agitación. Igualmente, estos ensayos se realizaron por triplicado, en días distintos. Los inóculos se mantuvieron 12 h.

A las 12 horas, se tomó la muestra y se hicieron comprobaciones densitométricas y de cultivo. Todas las pruebas densitométricas y de cultivo corroboraron el crecimiento individual de las bacterias en el frasco fermentador. Los resultados se presentan en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL) obtenidas de cada una de las cepas utilizadas de forma individual en el sistema de flujo continuo Lambda Minifor®.

Bacteria	UFC/ml
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	$8,6 \times 10^6 \pm 1 \times 10^6$
<i>Porphyromona gingivalis</i>	$1,8 \times 10^7 \pm 0,26 \times 10^7$
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	$1,25 \times 10^{12} \pm 0,5 \times 10^{12}$
<i>Veillonella parvula</i>	$1,2 \times 10^9 \pm 0,32 \times 10^9$
<i>Actinomyces naeslundii</i>	$8,24 \times 10^{10} \pm 0,25 \times 10^{10}$
<i>Streptococcus oralis</i>	$3,2 \times 10^{12} \pm 1 \times 10^{12}$

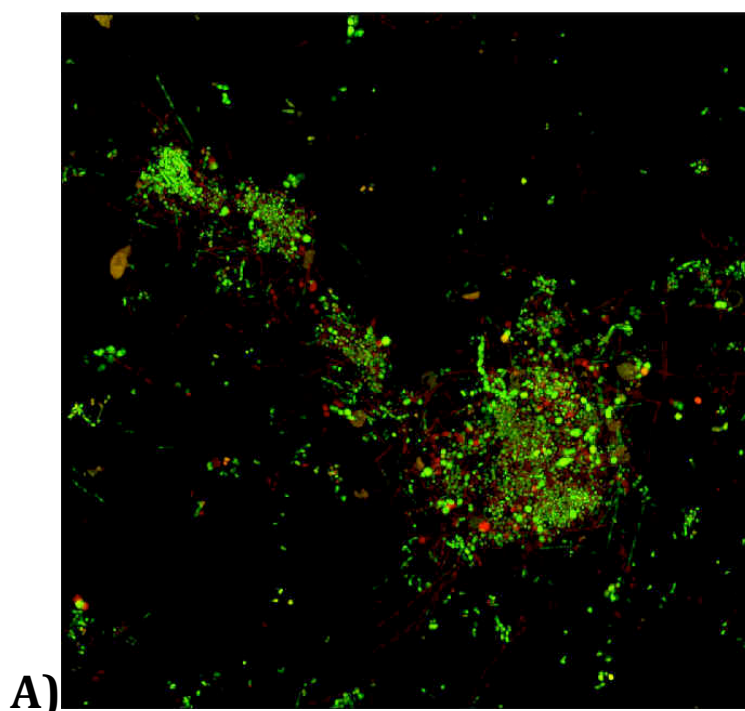
6.2. Análisis estructural y evaluación de la viabilidad de los biofilms por microscopía Laser Confocal (CLSM)

La morfogénesis de los biofilms de cada disco fueron examinados por CLSM en cada uno de los tiempos (1, 12, 24, 48, 72 y 96 h). El análisis se centró en el estudio de la arquitectura en tres dimensiones y la vitalidad que presentaban las bacterias a cada tiempo estudiado.

En las primeras 12 h tras la inoculación se observa una capa dispersa de bacterias adheridas a las tres superficies de estudio. Las células se organizan

como células individuales, como cadenas de estreptococos, o como agregados multicelulares; también pueden reconocerse los bacilos en forma de huso correspondientes a *F. nucleatum*.

A las 24 horas de desarrollo, la complejidad y el tamaño de las estructuras aumentan considerablemente. En la superficie de hidroxiapatita se observa una capa de células agrupadas en microcolonias o clusters formando prominencias. Esta estructura evoluciona en las siguientes 24 horas hacia la estructura típica de un biofilm, con capas de bacterias organizadas como capas homogéneas de células combinadas con grupos de bacterias apiladas en forma de “setas” o “torres”, mostrando canales en el interior de la estructura. Esta estructura se mantendrá hasta las 96 horas de incubación. Esto nos hace pensar que entre las 48 y las 72 horas de incubación, el biofilm habría podido alcanzar la madurez. La **figura 16** muestra un ejemplo de biofilm a las 48h y 72 h de desarrollo. En verde se observan las bacterias vivas y en rojo las bacterias muertas. Visualmente no se observan grandes diferencias en los biofilms a estos tiempos de incubación.



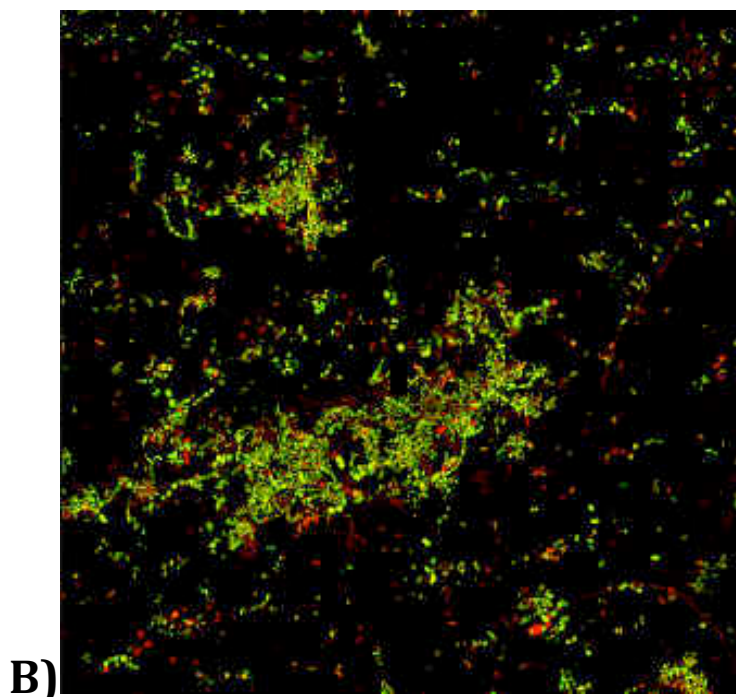


Figura 16: Micrograffas obtenidas por microscopía laser confocal (CLSM: A) Biofilm de 48h de incubación y B) Biofilm de 72h de incubación. Objetivo 60x en ambos casos.

Antes de comenzar nuestro análisis realizaremos un estudio en profundidad de los datos, observando el comportamiento de los mismos, viendo si cumplen hipótesis importantes que nos marcarán el resto del estudio, así como adecuarlos y simplificarlos de tal forma que podamos trabajar de forma cómoda y rigurosa sobre ellos. Para ello utilizaremos distintas técnicas estadísticas como, contrastes de hipótesis para pruebas de normalidad o pruebas de homogeneidad de varianzas si fuera necesario. Mostraremos también distintas medidas de interés para la investigación, como pueden ser medias o varianzas de las distintas muestras; a través de tablas que nos mostrarán los valores descriptivos de las distintas variables. Además de visualizar de forma gráfica el comportamiento de los datos para así intentar tratarlos de la forma más rigurosa posible.

La **Tabla 3** muestra el análisis estadístico descriptivo de los datos obtenidos para los biofilms de 48 y 72 horas de incubación en cuanto a altura y vitalidad alcanzada.

Tabla 3: Estadística descriptiva de la altura y vitalidad de los biofilms de 48 y 72 horas de incubación formados en el sistema Lambda Minifor®

Tº de incubación (h)			Altura (µm)	Vitalidad	Tº de incubación (h)			Altura (µm)	Vitalidad
48	Media		25,33	0,5285	72	Media		21,11	0,5218
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	21,77	0,3820		Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	16,98	0,3123
		Límite superior	28,90	0,6749			Límite superior	25,24	0,7314
	Media recortada al 5%		25,54	0,5467		Media recortada al 5%		21,29	0,5229
	Mediana		29,00	0,5682		Mediana		21,00	0,6148
	Varianza		21,500	363,121		Varianza		28,861	743,160
	Desv. típ.		4,637	0,19056		Desv. típ.		5,372	0,27261
	Mínimo		18	0,04		Mínimo		11	0,03
	Máximo		29	0,69		Máximo		28	0,99
	Rango		11	0,64		Rango		17	0,96
	Amplitud intercuartil		8	0,11		Amplitud intercuartil		8	0,31
48	Asimetría		-,689	-2,481	72	Asimetría		-,782	-,175
	Curtosis		-1,405	6,793		Curtosis		,224	,769

Fijándonos en las alturas alcanzadas (µm) por los biofilms en el sistema de flujo continuo Lambda Minifor® el biofilm de 48 h presenta un espesor medio de $25,33 \pm 3,56 \mu\text{m}$ y de $21,11 \pm 4,13 \mu\text{m}$ los biofilms de 72h (**Tabla 3; figura 17 y 19**).

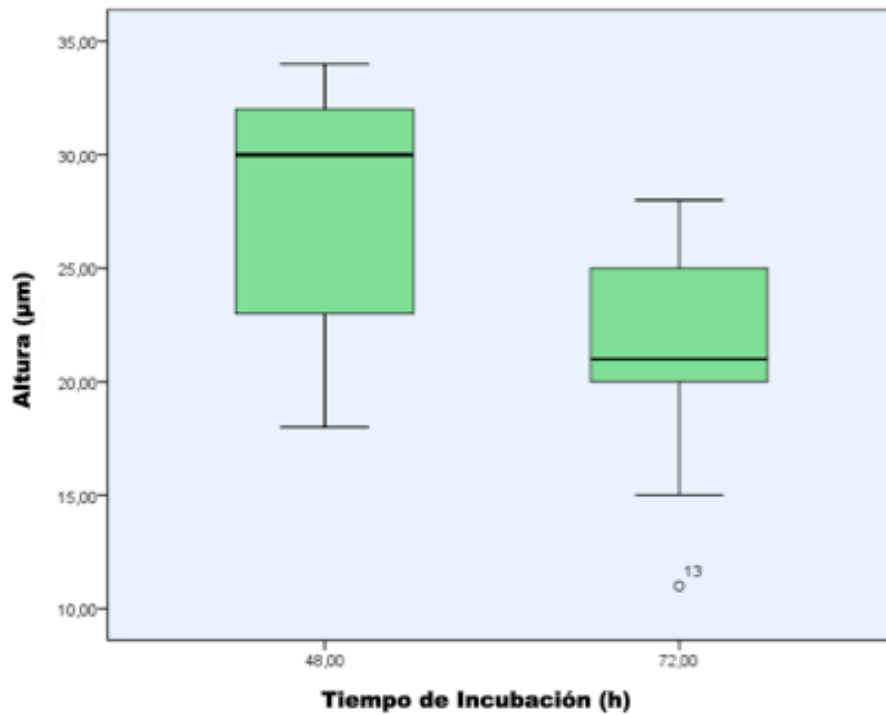


Figura 17: Representación en Boxplot de la altura alcanzada por los Biofilms de 48h y 72h

Así mismo, la vitalidad (ratio vivas/muertas) es de $52,85 \pm 14,65\%$ para los biofilms de 48 h y de $52,18 \pm 20,95\%$ para los biofilms de 72 h (**Tabla 3; figura 18 y 19**).

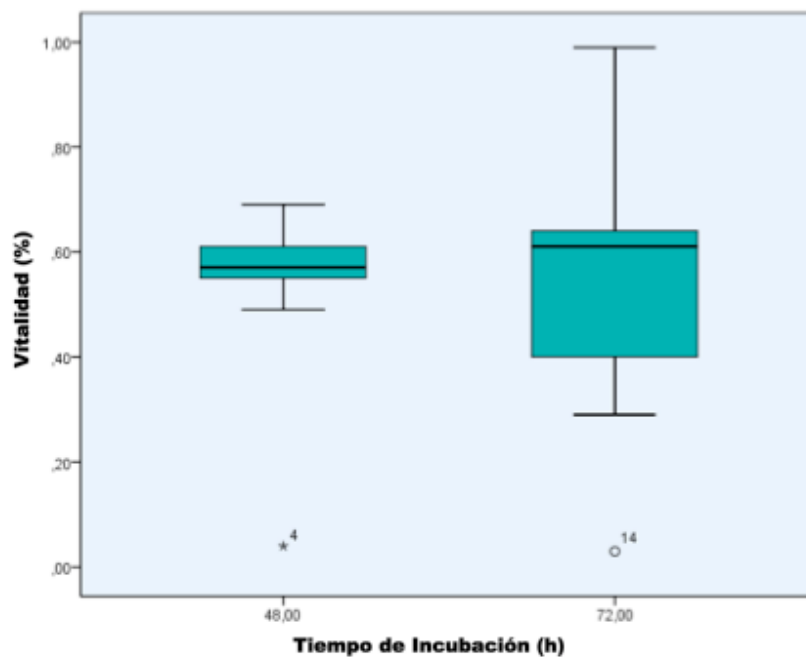


Figura 18: Representación en Boxplot de la vitalidad en los Biofilms de 48h y 72h

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al estudiar la altura alcanzada y la vitalidad al comparar los biofilms de 48h y 72h ($P < 0,05$).

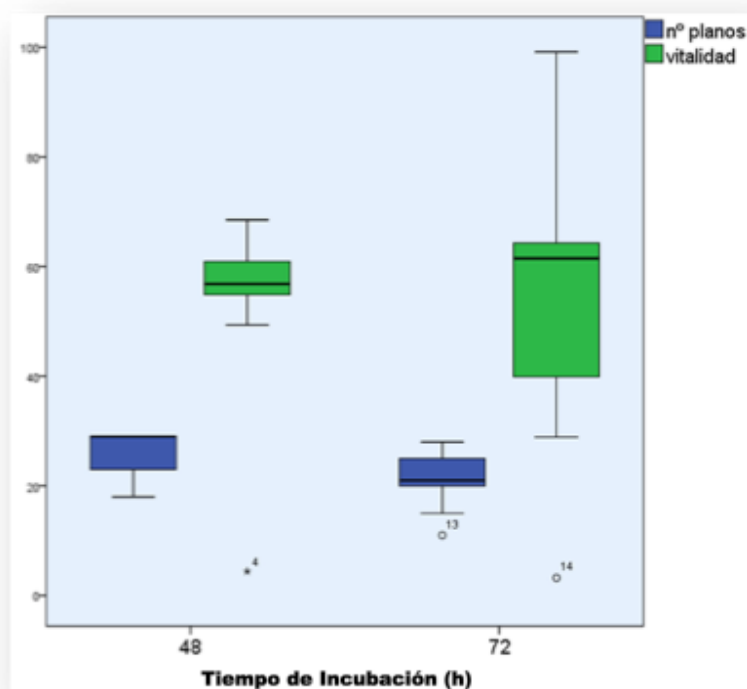


Figura 19: Representación en Boxplot de la Vitalidad y Altura en los biofilms de 48h y 72h

La **Tabla 4** refleja el número de planos que ocupa el biofilm (siendo cada plano correspondiente a 1 μm), la vitalidad total del biofilm, el plano de máxima vitalidad y el porcentaje de vitalidad en dicho plano. Podemos ver que la distribución de los planos de máxima vitalidad es muy homogénea para los biofilms de 48h, en cambio para los de 72h la distribución es bastante heterogénea. El plano con mayor vitalidad para los biofilms de 48h se suele encontrar en las capas más profundas, y este plano, suele tener una vitalidad muy alta.

Tabla 4: Representación tabulada de la altura y vitalidad de los biofilms de 48 y 72h

Experimento	n° Planos	Vitalidad Total	Plano Máxima Vitalidad	Vitalidad en Plano Máxima Vitalidad
B48hEXP1-1	23	49,35%	23	93,75%
B48hEXP1-2	19	56,82%	19	100,00%
B48hEXP1-3	18	60,90%	18	100,00%
B48hEXP2-1	23	4,42%	21	8,99%
B48hEXP2-2	31	54,87%	31	69,87%
B48hEXP2-3	30	68,52%	21	78,59%
B48hEXP3-1	32	55,19%	29	64,54%
B48hEXP3-2	34	60,12%	34	100,00%
B48hEXP3-3	33	65,44%	24	80,67%
B72hEXP1-1	26	61,48%	12	65,87%
B72hEXP1-2	23	66,75%	4	71,82%
B72hEXP1-3	21	63,09%	2	66,77%
B72hEXP2-1	11	42,80%	7	43,75%
B72hEXP2-2	21	3,24%	21	4,79%
B72hEXP2-3	20	39,91%	19	42,58%
B72hEXP3-1	15	28,91%	3	53,42%
B72hEXP3-2	25	63,54%	1	69,19%
B72hEXP3-3	28	99,14%	27	99,38%

La **figura 20** da información del porcentaje de volumen del biofilm ocupado por bacterias. Se observa que la concentración es mayor en el biofilm de 72h, y se puede añadir que estas diferencias son estadísticamente significativas ($p < 0,05$)

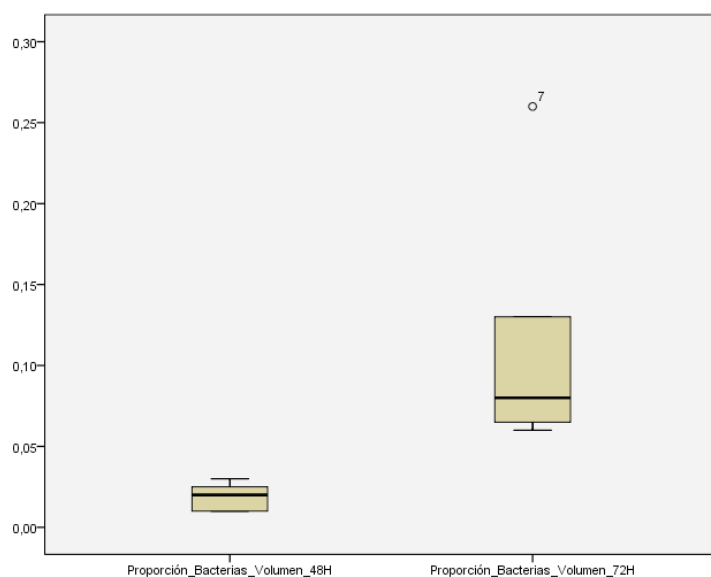


Figura 20: Boxplot de la proporción de bacterias/volumen en los biofilms de 48h y 72h

6.3. Análisis cuantitativo de los biofilms mediante la técnica de cultivo

Mediante la técnica de cultivo, se pudo observar la presencia de las seis bacterias desde el biofilm de 1 h de incubación (**figura 21**).

Los cultivos realizados a 1, 12, 24, 48, 72 y 96 h nos muestran la cinética de crecimiento de cada una de las bacterias en el interior del biofilm (**figura 22**).

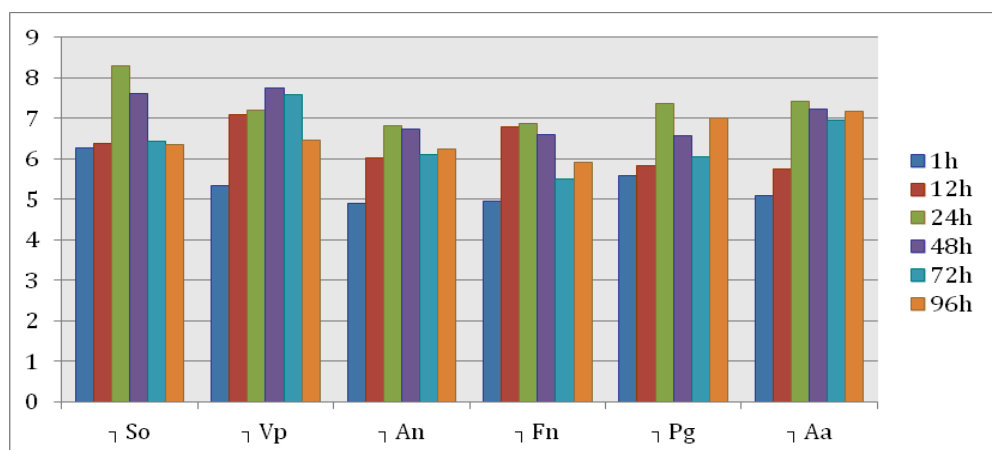


Figura 21: Representación del logaritmo de las ufc/ml de cada una de las especies bacterianas a los diferentes tiempos de incubación estudiados. So: *S. oralis*; Vp: *V. parvula*; An: *A. naeslundii*; Fn: *F. nucleatum*; Pg: *P. gingivalis*; Aa: *A. Actinomycetemcomitans*.

En la primera hora de incubación se observa ya la presencia de las 6 especies bacterianas, con un mayor número del colonizador primario *S. oralis*. Sorprendentemente, se observa un número importante de los colonizadores tardíos *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* (**figura 22**).

Al analizar el número de bacterias a las 12 horas se observa que, mientras que *S. oralis* no aumenta significativamente en número, si lo hacen los colonizadores primarios *V. parvula* y *A. naeslundii*. Igualmente se observa un aumento considerable de la bacteria *F. nucleatum*. En este caso, los colonizadores tardíos no aumentan significativamente.

Después de 24 horas, destaca el aumento de los colonizadores tardíos *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, junto con la bacteria *S.oralis*.

A las 48 horas de incubación, se observa un descenso en el número de bacterias viables para la mayoría de las bacterias implicadas en la formación del biofilm, que continúa a las 72 h de incubación.

A las 96 h todas las especies, a excepción de *S. oralis* y *V. parvula*, presentan un crecimiento, destacando el de *P. gingivalis* y también, en menor medida el de *F. nucleatum* y *A. actinomycetemcomitans*. También destacando por el lado opuesto, el descenso de *V. parvula*.

Podemos observar que, estudiando la evolución temporal del número de bacterias, de forma conjunta, la tendencia al crecimiento bacteriano es más marcada hasta las 24h, estabilizándose para el resto de los tiempos de incubación (**figura 22**).



Figura 22: Representación de la evolución temporal de los logaritmo de las ufc/ml de cada una de las especies bacterianas a los diferentes tiempos de incubación estudiados. So: *S. oralis*; Vp: *V. parvula*; An: *A. naeslundii*; Fn: *F. nucleatum*; Pg: *P. gingivalis*; Aa: *A. Actinomycetemcomitans*.

En la **figura 23** podemos ver de forma más exhaustiva el comportamiento del nivel bacteriano en cada uno de los momentos, teniendo en cuenta todas las mediciones.

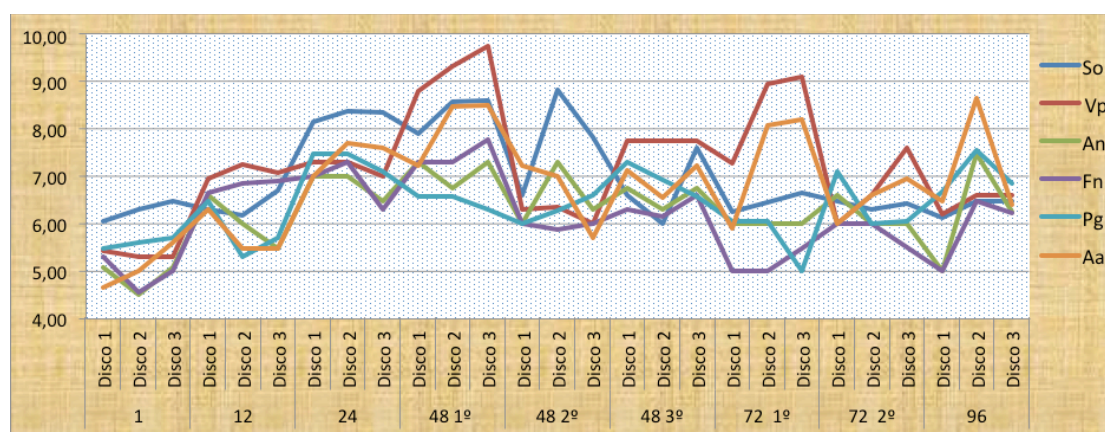


Figura 23: Gráfica de la evolución en el tiempo de los logaritmo de las ufc/ml de cada una de las especies bacterianas a los diferentes tiempos de incubación estudiados por disco de estudio. So: *S. oralis*; Vp: *V. parvula*; An: *A. naeslundii*; Fn: *F. nucleatum*; Pg: *P. gingivalis*; Aa: *A. Actinomycetemcomitans*.

7. Discusión

Los resultados de este trabajo de investigación muestran los primeros pasos en la puesta a punto de un modelo de biofilm subgingival *in vitro*, reproducible y sencillo de manejar, que nos va a permitir obtener biofilms maduros que simulan a los biofilms subgingivales *in vivo*, como herramienta útil de estudio de las diferentes variables que afectan a estas comunidades, con el que en un futuro poder realizar análisis muy diversos, desde el estudio de la susceptibilidad de unión y posterior formación de un biofilm oral a una determinada superficie hasta el estudio del efecto de sustancias antisépticas sobre las bacterias orales en biofilm.

La naturaleza del biofilm oral es compleja y variable: estos biofilms pueden albergar hasta 200 especies conviviendo en un individuo sano (Kolenbrander et al. 2010)(Dewhirst et al. 2010)(Filoche et al. 2009), estructuralmente adquieren una gran complejidad y tienen lugar un gran número de interacciones entre las bacterias que conviven en ellos. En la literatura, pocos son los modelos descritos de biofilms subgingivales, y es que su desarrollo no está exento de dificultades. Stoodley y cols. (2004) (Hall-Stoodley et al. 2004) atribuyen gran parte del retraso en el estudio de los biofilms a la dificultad de trabajar con estas poblaciones heterogéneas en comparación con el estudio, que desde hace unos años se venía realizando, de poblaciones planctónicas homogéneas, sumado a las consideraciones éticas asociadas con el estudio microbiológico *in vivo* en pacientes con enfermedad periodontal o caries dental.

En primer lugar, se han seleccionado seis bacterias diferentes para este estudio, basándonos en la participación, en la composición del biofilm, de una o dos

especies bacterianas pertenecientes a los diferentes clusters o complejos descritos por Socransky y cols. (Socransky et al. 1998), basados en la incorporación temporal de estas al biofilm dental. Las especies seleccionadas son las que frecuentemente se localizan en la placa subgingival (Ximénez-Fyvie et al. 2000)(Paster et al. 2005)(Ledder et al. 2006)) e incluye colonizadores primarios (*S. oralis* y *A. naeslundii*), tempranos (*V. parvula*), secundarios (*F. nucleatum*) y tardíos (*P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*). Cada uno juega un papel fundamental en la formación del biofilm, los iniciales para formar la base sobre la que se cimentara el biofilm, *F. nucleatum*, porque es una bacteria conocida como “puente” de unión entre los primarios y tardíos. Esto se debe a unas prolongaciones citoplasmáticas que tiene, que sirven de unión para estas últimas. Los tardíos, *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* tienen su importancia ya que son los mas periodontopatógenos.

Con respecto al número de bacterias seleccionadas, utilizamos seis bacterias diferentes, a diferencia de otros estudios, que utilizan como inóculo placa dental de pacientes, lo que conlleva una alta variabilidad inter-experimento o, en otros casos, solo dos o tres especies bacterianas. En la literatura se han utilizado desde dos a seis especies bacterianas (Foster & Kolenbrander 2004)(Wei et al. 2006)(Helmerhorst et al. 1999)(Corbin et al. 2011). La razón de incluir 6 bacterias es la de la existencia de interacciones bacterianas que favorecen el crecimiento simbiótico entre estas. Por ejemplo, el crecimiento de las especies *S. oralis*, *V. parvula* y *P. gingivalis* en conjunto se ve acrecentado mutuamente (Guggenheim & Meier 2011). El cultivo simultáneo del género *Actinomyces* y de *P. gingivalis* también favorece el crecimiento de ambas. Algo similar ocurre con *A. actinomycetemcomitans* y *P. gingivalis* o *F. nucleatum* y *P. gingivalis* (Periasamy

& Kolenbrander 2010). Aún y todo cabe mencionar que estos son factores favorecedores, puesto que el medio de cultivo es muy rico en nutrientes.

Una de las claves para trabajar con éxito con biofilms orales *in vitro* es utilizar un medio de cultivo específico para su crecimiento (Guggenheim et al. 2001). En nuestro caso, hemos formulado un medio de cultivo, que denominamos BHI2, que contiene una proporción elevada de proteínas, similar tanto al fluido gingival crevicular, principal fuente de nutrientes de las bacterias subgingivales *in vivo*, como a la saliva, puesto que incorpora mucina. Ésta es fundamental para la formación de la película adquirida sobre la superficie en la que se va a generar el biofilm. Entre los diferentes modelos de biofilm utilizados para reproducir la placa dental, en nuestra opinión, el más representativo de ellos es el biorreactor asociado a un sistema de flujo continuo. El biorreactor será suplementado con el medio de cultivo formulado, a una velocidad de flujo constante adecuada para el crecimiento de las bacterias y lo más similar posible al de la cavidad oral.

La superficie sobre la que se desarrolla un biofilm tiene una importante influencia en numerosos aspectos de las bacterias implicadas, entre los que se incluyen el ratio de unión de las bacterias a la superficie, la influencia en el fenotipo de las bacterias, o la modificación en la producción de factores de virulencia y en la producción de polisacárido extracelular. Se ha escogido el material de hidroxapatita puesto que es la que más simula al diente. En un futuro próximo también probaremos a realizar este mismo experimento sobre superficies de titanio, zirconio, etc.

En cuanto al sistema utilizado, igualmente juega un papel fundamental a la hora de conseguir un modelo de biofilm *in vitro* adecuado para estudiar la estructura,

formación y evolución de la placa subgingival. Con el fin de imitar el biofilm subgingival varios investigadores han desarrollado modelos de biofilm realizando ensayos tanto estáticos como dinámicos. Se han intentado llevar a cabo varios modelos diferentes. Uno se basaba en la inserción de diferentes materiales en las bolsas periodontales de pacientes (Takeuchi et al. 2004)(Wecke et al. 2000). Otros, utilizando placa subgingival dispersa o una selección de bacterias subgingivales específicas en ensayos con placas de microvaloración o en sistemas de fermentación constante de (Periasamy & Kolenbrander 2009)(Hope & Wilson 2006)(Kuramitsu et al. 2005)(Walker & Sedlacek 2007)(Tamura et al. 2008). Muy pocos de estos estudios han permitido obtener información de cómo madura la placa subgingival y la secuencia de eventos que ocurren en el desarrollo del biofilm dental.

Como comentado con anterioridad, el objetivo de este estudio ha sido la puesta a punto de un sistema de flujo continuo que sea lo más semejante posible a las condiciones dadas en la cavidad oral: temperatura, pH, flujo de líquidos, etc. Ha habido estudios previos que han utilizado diferentes sistemas estáticos, como el de Sánchez et al. 2011 (Sánchez et al. 2011) o el estudio de Guggenheim et al. 2001 (Guggenheim et al. 2001) el “Calgary Biofilm Device” (Wei et al. 2006). Estos estudios, no obstante, no imitan las condiciones fisiológicas de la boca con exactitud, puesto que carecen del dinamismo característico de la misma.

Las bacterias en la cavidad oral están sometidas al flujo salivar y crevicular de una manera constante. Estos flujos condicionan las propiedades estructurales (topográficas y arquitectónicas) y fisiológicas del biofilm bacteriano formado sobre la superficie dental. Por consiguiente los modelos estáticos, necesarios en

un principio, no serían suficientes para simular estas condiciones dadas en la cavidad oral. De hecho hay estudios que demuestran que la estructura y propiedades del biofilm son diferentes dependiendo de si se trata de un modelo estático o dinámico (Vaughan et al. 2010)(Drescher et al. 2011). Más específicamente, Laue y cols. 2006 (Laue et al. 2006) observó diferencias temporales en algunos patrones de expresión de algunos componentes de la matriz extracelular de la *P. aeruginosa*. Maezono y cols. 2011 (Maezono et al. 2011) descubrió que la resistencia a la eritromicina por parte de *P. gingivalis* era mayor cuando ésta estaba cultivada en un sistema fluido, frente al estático. También se ha descrito, en *S. epidermidis*, que el dinamismo induce la expresión de la adhesina polisacáridica intercelular (PIA), influenciando la estructura del biofilm. Se compararon tasas de flujo muy bajas, de 18 µl/min y de 4,5 µl/min, y se vieron diferencias en la expresión de este polisacárido y la estructura del biofilm (Foka et al. 2011)(Weaver et al. 2012). Como se puede ver en estos estudios, el dinamismo y su tasa de flujo son de gran influencia en la formación de un biofilm, ocasionando cambios estructurales y de composición. Por consiguiente, es necesario un biofilm dinámico a la hora de generar un sistema que intente imitar el biofilm que se forma sobre la superficie dental. A día de hoy no se ha estudiado la influencia de ésta variable, de aquí la importancia del desarrollo de éste tipo de sistemas, ya que ésta variable puede ser un factor significativo en la estructura del biofilm y en la resistencia bacteriana a antimicrobianos.

El estudio muestra los datos pioneros en la puesta a punto del sistema de flujo continuo para generar un biofilm oral. Se ha comprobado que el sistema es compatible con el crecimiento de las 6 bacterias seleccionadas, tanto de manera

independiente como en conjunto, siendo capaces de organizarse en biofilm a lo largo del período de incubación empleado (hasta 96 horas de incubación).

El análisis del biofilm generado por Microscopía Laser Confocal (CLSM), y el posterior tratamiento de las imágenes obtenidas con el programa Metamorph®, ha permitido obtener una proyección tridimensional del mismo y observar la disposición espacial de las células dentro de la matriz que lo compone. Al utilizar los fluorocromos “SYTO 9 green-fluorescent nucleic acid stain” y “Ioduro de Propidio red-fluorescent nucleic acid stain”, se ha podido analizar y cuantificar relativamente el número de bacterias vivas y muertas, así como la tendencia de distribución de las células viables y no viables a lo largo de todo el biofilm.

De acuerdo con lo publicado por otros autores, nuestro modelo presenta una disposición estructural representativa de la placa dental (Netuschil et al. 1998)(Auschill et al. 2001)(Dige et al. 2009)(Pratten et al. 2000)Hope & Wilson 2006) a partir de las 48h, alcanzando la madurez entre las 48 y 72 h, observándose a partir de las 72 h un descenso en general en la vitalidad celular. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas tanto en la altura como en la vitalidad alcanzada por los biofilms de 48 y 72 horas de incubación ($p>0,05$ en ambos casos), lo que nos indica que el biofilm se encuentra en una fase de estabilidad en cuanto a su composición. En ambos casos, la vitalidad que presenta corrobora lo postulado por Branda y cols. (2005), que afirman que los biofilms maduros presentan tan solo alrededor del 50% de sus células vivas.

La mayor vitalidad es observada en las capas más profundas del biofilm de 48 h, en cambio a las 72 h de incubación el biofilm presenta una mayor variabilidad en

cuanto a ésta distribución, presentando una vitalidad menor en las capas profundas (**figura 18**). Esto podría ser debido a que a medida que el biofilm va madurando las capas más profundas del mismo se quedan sin acceso a nutrientes, a pesar de los gradientes generados y los canales existentes para el paso de estos.

En lo referente a la proporción de bacterias/volumen del biofilm, se observa diferencia estadísticamente significativa cuando se comparan los biofilms de 48 y 72 h de incubación, observándose mayor número de bacterias por volumen de biofilm en el de 72 h de incubación (**figura 20**).

A partir del estudio del crecimiento bacteriano por cultivo, se observó que las bacterias *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* están en menor número en los biofilms más jóvenes (exceptuando el de 1 h de incubación), en cambio en los más maduros, véase el de 96 h, son las dos especies bacterianas más abundantes (**figura 22**). Esto puede ser debido a su condición de colonizadores tardíos, que el biofilm al madurar e ir cambiando de bacterias anaeróbicas facultativas, pasa a uno con mayor abundancia de las bacterias anaeróbicas estrictas, que son estas últimas. Lo contrario sucede con los colonizadores primarios y tempranos, *S. oralis*, *A. naeslundii* y *V. parvula*, al principio en mayor abundancia, y a medida que el biofilm va madurando y cambiando a uno con mayor abundancia de bacterias anaeróbicas estrictas, van disminuyendo en número (Socransky et al. 1998). Con respecto a *F. nucleatum*, ésta bacteria, siempre se halla en concentraciones modestas, como le ocurre a otros. Esta dinámica de incorporación en el biofilm concuerda por lo descrito por otros autores ((Kolenbrander et al. 2010)).

Por tanto, se ha podido comprobar que el sistema es capaz de generar biofilms a partir de las especies bacterianas seleccionadas, incluidas ya desde la primera hora de generación, que siguen la cinética de incorporación descrita *in vivo*, y que alcanza la madurez adecuada a las 72 h. Serán necesarios más análisis y repeticiones de los ensayos para corroborar los datos presentados en la memoria.

8. Conclusiones

- El biorreactor Lamba Minifor® es óptimo para el desarrollo de biofilms orales *in vitro*.
- Las seis cepas bacterianas seleccionadas son válidas para el estudio, y constituyen un buen cimientto para el desarrollo del biofilm en el sistema de flujo Lambda Minifor®.
- Los resultados obtenidos por CLSM nos indican que entre 1h y 96h de incubación se forman biofilms maduros.
- Por CLSM hemos observado que el biofilm alcanza la madurez entre las 48h y 72h, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre ambos biofilms en cuanto a altura y vitalidad. Sin embargo, si se observan diferencias estadísticamente significativas en la concentración de bacterias en volumen del biofilm, siendo mayor a las 72h.
- Los resultados del cultivo nos demuestran que los biofilms alcanzan la estabilidad entre las 48h y 72h, y que a partir de este último tiempo de incubación se ve un descenso general del número de bacterias (ufc/ μ l), pudiendo concluir que estos biofilms se hallan en la “fase estacionaria o de madurez”, fase idónea para posteriores estudios.
- La dinámica de incorporación de las bacterias utilizadas en el modelo de biofilm puesto a punto concuerda con lo descrito por otros autores, tanto *in vitro* como *in vivo*.

9. Bibliografía

- Aas, J.A.J. et al., 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), pp.5721–5732.
- Auschill, T.M.T. et al., 2001. Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Archives of Oral Biology*, 46(5), pp.471–476.
- Baelum, V. & Fejerskov, O., 1986. Tooth loss as related to dental caries and periodontal breakdown in adult Tanzanians. *Community dentistry and oral epidemiology*, 14(6), pp.353–357.
- Baelum, V., Fejerskov, O. & Manji, F., 1988. Periodontal diseases in adult Kenyans. *Journal of Clinical Periodontology*, 15(7), pp.445–452.
- BECK, J. et al., 2005. Associations between IgG antibody to oral organisms and carotid intima–medial thickness in community-dwelling adults. *Atherosclerosis*, 183(2), pp.342–348.
- Beck, J.D. et al., 2001. Relationship of periodontal disease to carotid artery intima-media wall thickness: the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21(11), pp.1816–1822.
- Beighton, D., 2009. Can the ecology of the dental biofilm be beneficially altered? *Advances in Dental Research*, 21(1), pp.69–73.
- Blanc, V. et al., 2013. Characterization and application of a flow system for in vitro multispecies oral biofilm formation - Blanc - 2013 - Journal of Periodontal Research - Wiley Online Library. *Journal of Periodontal Research*.
- Corbin, A.A. et al., 2011. Antimicrobial penetration and efficacy in an in vitro oral biofilm model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), pp.3338–3344.
- Costerton, J.W.J., Stewart, P.S.P. & Greenberg, E.P.E., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), pp.1318–1322.
- Desvarieux, M. et al., 2005. Periodontal microbiota and carotid intima-media thickness: the Oral Infections and Vascular Disease Epidemiology Study (INVEST). *Audio and Electroacoustics Newsletter, IEEE*, 111(5), pp.576–582.
- Dewhirst, F.E. et al., 2010. The Human Oral Microbiome. *Journal of Bacteriology*, 192(19), pp.5002–5017.
- Diaz, P.I.P. et al., 2006. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), pp.2837–2848.

- Dige, I. et al., 2009. Actinomyces naeslundii in initial dental biofilm formation. *Microbiology*, 155(7), pp.2116–2126.
- Donlan, R.M. & Costerton, J.W., 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), pp.167–193.
- Drescher, K. et al., 2011. Fluid dynamics and noise in bacterial cell-cell and cell-surface scattering. *PNAS*, 108(27), pp.10940–10945.
- Engebretson, S.P. et al., 2005. Radiographic measures of chronic periodontitis and carotid artery plaque. *Audio and Electroacoustics Newsletter, IEEE*, 36(3), pp.561–566.
- Filoche, S., Wong, L. & Sissons, C.H., 2009. Oral Biofilms: Emerging Concepts in Microbial Ecology. *Journal of Dental Research*, 89(1), pp.8–18.
- Foka, A.A. et al., 2011. The combined effect of surface chemistry and flow conditions on Staphylococcus epidermidis adhesion and ica operon expression. *European cells & materials*, 24, pp.386–402.
- Foster, J.S. & Kolenbrander, P.E., 2004. Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(7), pp.4340–4348.
- Goepfert, A.R.A. et al., 2004. Periodontal disease and upper genital tract inflammation in early spontaneous preterm birth. *Obstetrics & Gynecology*, 104(4), pp.777–783.
- Guggenheim, B. & Meier, A., 2011. In vitro effect of chlorhexidine mouth rinses on polyspecies biofilms. *Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin = Revue mensuelle suisse d'odonto-stomatologie = Rivista mensile svizzera di odontologia e stomatologia / SSO*, 121(5), pp.432–441.
- Guggenheim, B. et al., 2001. Validation of an in vitro biofilm model of supragingival plaque. *Journal of Dental Research*, 80(1), pp.363–370.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W. & Stoodley, P., 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews: Microbiology*, 2(2), pp.95–108.
- Helmerhorst, E.J. et al., 1999. The effects of histatin-derived basic antimicrobial peptides on oral biofilms. *Journal of Dental Research*, 78(6), pp.1245–1250.
- Hope, C.K.C. & Wilson, M.M., 2006. Biofilm structure and cell vitality in a laboratory model of subgingival plaque. *Journal of Microbiological Methods*, 66(3), pp.9–9.
- Huang, R., Li, M. & Gregory, R., 2011. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*, 2(5), pp.435–444.
- Jarjoura, K.K. et al., 2005. Markers of periodontal infection and preterm birth.

American Journal of Obstetrics and Gynecology, 192(2), pp.7–7.

Jeffcoat, M.K.M. et al., 2001. Periodontal infection and preterm birth: results of a prospective study. *Journal Of The American Dental Association (Edizione Italiana)*, 132(7), pp.875–880.

Jenkinson, H.F. & Lamont, R.J., 2005. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends in Microbiology*, 13(12), pp.7–7.

Kolenbrander, P.E.P. & London, J.J., 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *Journal of Bacteriology*, 175(11), pp.3247–3252.

Kolenbrander, P.E.P. et al., 2002. Communication among oral bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), pp.486–contents.

Kolenbrander, P.E.P. et al., 2010. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Audio, Transactions of the IRE Professional Group on*, 8(7), pp.471–480.

Kolenbrander, P.E.P., Andersen, R.N.R. & Moore, L.V.L., 1990. Intrageneric coaggregation among strains of human oral bacteria: potential role in primary colonization of the tooth surface. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(12), pp.3890–3894.

Kuramitsu, H.K.H., Chen, W.W. & Ikegami, A.A., 2005. Biofilm formation by the periodontopathic bacteria *Treponema denticola* and *Porphyromonas gingivalis*. *Journal of Periodontology*, 76(11 Suppl), pp.2047–2051.

Laue, H.H. et al., 2006. Contribution of alginate and levan production to biofilm formation by *Pseudomonas syringae*. *Microbiology*, 152(Pt 10), pp.2909–2918.

Ledder, R.G. et al., 2006. Molecular analysis of the subgingival microbiota in health and disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(2), pp.516–523.

Löe, H.H. et al., 1978. The natural history of periodontal disease in man. The rate of periodontal destruction before 40 years of age. *Journal of Periodontology*, 49(12), pp.607–620.

Löe, H.H., THEILADE, E.E. & JENSEN, S.B.S., 1965. EXPERIMENTAL GINGIVITIS IN MAN. *The Journal of periodontology*, 36, pp.177–187.

Maezono, H.H. et al., 2011. Antibiofilm effects of azithromycin and erythromycin on *Porphyromonas gingivalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(12), pp.5887–5892.

Marsh, P.D.P., 2004. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of Clinical Periodontology*, 32 Suppl 6, pp.7–15.

Netuschil, L.L. et al., 1998. A pilot study of confocal laser scanning microscopy for

- the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Archives of Oral Biology*, 43(4), pp.277–285.
- Offenbacher, S.S. et al., 1996. Periodontal infection as a possible risk factor for preterm low birth weight. *Journal of Periodontology*, 67(10 Suppl), pp.1103–1113.
- Paster, B.J.B. et al., 2005. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology 2000*, 42, pp.80–87.
- Periasamy, S. & Kolenbrander, P.E., 2010. Central role of the early colonizer *Veillonella* sp. in establishing multispecies biofilm communities with initial, middle, and late colonizers of enamel. *Journal of Bacteriology*, 192(12), pp.2965–2972.
- Periasamy, S. & Kolenbrander, P.E., 2009. Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel. *Journal of Bacteriology*, 191(22), pp.6804–6811.
- Post, J.C. et al., 2004. The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 12(3), p.185.
- Pratten, J. et al., 2000. Structural studies of microcosm dental plaques grown under different nutritional conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 189(2), pp.215–218.
- Pussinen, P.J.P. et al., 2004. Antibodies to periodontal pathogens and stroke risk. *Stroke*, 35(9), pp.2020–2023.
- Saremi, A.A. et al., 2004. Periodontal disease and mortality in type 2 diabetes. *Diabetes Care*, 28(1), pp.27–32.
- Sánchez, M.C. et al., 2011. Structure, viability and bacterial kinetics of an in vitro biofilm model using six bacteria from the subgingival microbiota. *Journal of Periodontal Research*, 46(2), pp.252–260.
- Scannapieco, F.A., Bush, R.B. & Paju, S., 2003. Associations Between Periodontal Disease and Risk for Nosocomial Bacterial Pneumonia and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. A Systematic Review. *Annals of Periodontology*, 8(1), pp.54–69.
- Scannapieco, F.A.F., 1999. Role of oral bacteria in respiratory infection. *Journal of Periodontology*, 70(7), pp.793–802.
- Scannapieco, F.A.F., Stewart, E.M.E. & Mylotte, J.M.J., 1992. Colonization of dental plaque by respiratory pathogens in medical intensive care patients. *Critical Care Medicine*, 20(6), pp.740–745.
- Sedlacek, M.J.M. & Walker, C.C., 2007. Antibiotic resistance in an in vitro subgingival biofilm model. *Oral Microbiology and Immunology*, 22(5), pp.333–339.

- Seppälä, B., Seppälä, M. & Ainamo, J., 1993. A longitudinal study on insulin-dependent diabetes mellitus and periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 20(3), pp.161–165.
- Siegrist, B.E. et al., 1991. In vivo early human dental plaque formation on different supporting substances. A scanning electron microscopic and bacteriological study. *Clinical Oral Implants Research*, 2(1), pp.38–46.
- Socransky, S.S.S. et al., 1998. Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), pp.134–144.
- Takeuchi, H., Yamanaka, Y. & Yamamoto, K., 2004. Morphological analysis of subgingival biofilm formation on synthetic carbonate apatite inserted into human periodontal pockets. *Australian Dental Journal*, 49(2), pp.72–77.
- Tamura, A. et al., 2008. The effects of antibiotics on in vitro biofilm model of periodontal disease. *European journal of medical research*, 13(9), pp.439–445.
- Taylor, C.J. & Mahenthiralingam, E., 2006. Functional foods and paediatric gastrointestinal health and disease. *Annals of tropical paediatrics*, 26(2), pp.79–86.
- Taylor, G.W.G. et al., 1998. Glycemic control and alveolar bone loss progression in type 2 diabetes. *Annals of Periodontology*, 3(1), pp.30–39.
- Taylor, G.W.G. et al., 1996. Severe periodontitis and risk for poor glycemic control in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Periodontology*, 67(10 Suppl), pp.1085–1093.
- THEILADE, E. & THEILADE, J., 1985. Formation and ecology of plaque at different locations in the mouth. *European Journal of Oral Sciences*.
- Vaughan, B.L., Smith, B.G. & Chopp, D.L., 2010. The influence of fluid flow on modeling quorum sensing in bacterial biofilms. *Bulletin of Mathematical Biology*, 72(5), pp.1143–1165.
- Walker, C. & Sedlacek, M.J., 2007. An in vitro biofilm model of subgingival plaque. *Oral Microbiology and Immunology*, 22(3), pp.152–161.
- Weaver, W.M.W. et al., 2012. Fluid flow induces biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intracellular adhesin-positive clinical isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(16), pp.5890–5896.
- Wecke, J.R. et al., 2000. A novel technique for monitoring the development of bacterial biofilms in human periodontal pockets. *FEMS Microbiology Letters*, 191(1), pp.95–101.
- Wei, G.-X.G., Campagna, A.N.A. & Bobek, L.A.L., 2006. Effect of MUC7 peptides on the growth of bacteria and on *Streptococcus mutans* biofilm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(6), pp.1100–1109.

Ximénez-Fyvie, L.A.L., Haffajee, A.D.A. & Socransky, S.S.S., 2000. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 27(9), pp.648–657.

